

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
30 de Agosto de 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 01/62274 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: A61K 38/19,  
38/20, 48/00, A61P 35/00

(ES). PRIETO VALTUEÑA, Jesús [ES/ES]; Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona (ES).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES01/00066

(74) Mandatario: DE ELZABURU, Alberto; Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:

22 de Febrero de 2001 (22.02.2001)

(81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 200000459 25 de Febrero de 2000 (25.02.2000) ES

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIGO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*):  
**INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A. [ES/ES]**; Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona (ES).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: COMBINED USE OF CHEMOKINE IP-10 AND INTERLEUKIN 12 IN THE PREPARATION OF COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF MALIGNANT TUMORS

(54) Título: USO COMBINADO DE LA QUIMIOCINA IP-10 Y LA INTERLEUCINA-12 EN LA PREPARACION DE COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES MALIGNOS

(57) Abstract: The invention concerns the combined use of chemokine IP-10 and interleukin 12 as therapy against malignant tumors and the use of IP-10 to potentiate the anti-tumoral effect of IL-12. Said substances are immunomodulating proteins enhancing anti-tumoral response. Combined administration of both substances to mammals makes it possible to enhance anti-tumoral activity in the tumor carrying mammal. Administration of both substances can be realized by means of a recombinant protein prepared in-vitro or by means of expression systems or gene transfer expressing said substances. The combination of both substances has a synergistic effect in the specific induction of cytotoxic lymphocytes against tumors. Combination of both substances in adequate proportions and dose can be useful in the treatment of any type of cancer, for instance adenocarcinoma of the colon.

(57) Resumen: La invención se relaciona con el uso combinado de la quimiocina IP-10 y la interleucina-12 como terapia frente a tumores malignos, así como el uso de IP-10 para potenciar el efecto antitumoral de IL-12. Estas dos sustancias son proteínas inmunomoduladoras que potencian la respuesta antitumoral. La administración en mamíferos de ambas sustancias en combinación permite aumentar la actividad antitumoral en el mamífero portador del tumor. La administración de ambas sustancias puede realizarse mediante proteína recombinante preparada in-vitro o mediante sistemas de expresión o transferencia génica que expresen dichas sustancias. La combinación de ambas sustancias tiene un efecto sinérgico en la inducción de linfocitos citotóxicos específicos frente a tumores. La combinación de ambas sustancias, en las proporciones y dosis adecuadas para cada caso, puede ser útil para el tratamiento de cualquier tipo de cáncer como por ejemplo el adenocarcinoma de colon.

WO 01/62274 A1

- 1 -

USO COMBINADO DE LA QUIMIOCINA IP-10 Y LA INTERLEUCINA-12 EN LA  
PREPARACION DE COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE  
TUMORES MALIGNOS.

5    Campo de la invención

La invención descrita comprende la utilización terapéutica de la combinación de dos sustancias inmunoreguladoras, proteína inducible por interferon  $\gamma$  de 10kD (IP-10) e interleucina-12 (IL-12), para combatir enfermedades de origen neoplásico y/o aumentar la intensidad de la respuesta inmunitaria de linfocitos T citotóxicos. Hemos comprobado que la combinación de ambas sustancias permite alcanzar una eficacia antitumoral mayor que la obtenida con cada una de ellas por separado, que su uso combinado aumenta la actividad citotóxica específica mediada por linfocitos T CD8 $^{+}$  frente a las células tumorales y que IP-10 aumenta el efecto antitumoral de IL-12 de forma sinérgica. Asimismo hemos demostrado que la administración de una combinación de dichas sustancias conlleva el rechazo de nódulos tumorales distantes no tratados y protege frente a la aparición de nuevos nódulos tumorales siendo éste un modelo de la enfermedad tumoral metastásica como por ejemplo el carcinoma de colon avanzado. La administración de ambas sustancias puede realizarse mediante la inyección de proteína recombinante o mediante el uso de sistemas de expresión o transferencia de genes que codifican para IP-10 e IL-12 de modo que se expresen. La invención descrita tiene aplicación en la preparación de fármacos o composiciones terapéuticas para el tratamiento de pacientes afectados por tumores malignos de cualquier tipo.

Estado de la técnica

30              La proteína inducible por interferon gamma-10 (IP-10)(1,2) cuyo análogo en ratones se denomina Crg-2 (3,4), es una quimiocina que pertenece a la familia de las  $\alpha$ -quimiocinas o CXC quimiocinas capaz de estimular al menos el

- 2 -

receptor de quimiocinas CXCR3 (5-7). El patrón de expresión del receptor CXCR3 explica que IP-10 sea capaz de atraer, al menos in-vitro, exclusivamente linfocitos T activados y células NK, pero no linfocitos vírgenes (5, 8-10). Líneas celulares tumorales capaces de expresar establemente IP-10 5 son rechazadas mediante mecanismos inmunitarios (11). Además, se ha demostrado que IP-10 posee propiedades antitumorales basadas en su capacidad para inhibir la angiogénesis tumoral (12-14). Dicho efecto angiostático parece que no está mediado por el receptor CXCR3 (15) y tiene gran importancia en los efectos antitumorales de IL-12 en algunos modelos 10 animales (16).

Otros genes de quimiocinas como el gen de linfotactina (17) o de MIP1- $\alpha$  (18) han sido transfectados en células tumorales donde, al expresarse y a pesar de atraer linfocitos T al tejido maligno, no se consigue el rechazo tumoral (17,18). Sin embargo la combinación de dichas quimiocinas con otras citocinas 15 o moléculas coestimuladoras con capacidad para activar linfocitos, tales como IL-2, B7-1 e IL-12, tiene como resultado un destacado efecto antitumoral (17,19,20).

La interleucina-12 es una citocina producida naturalmente por macrófagos (21) y células dendríticas (22) que juega un papel central en la 20 inducción de las respuestas inmunes celulares (23). Se ha observado que la IL-12 es capaz de inducir efectos antitumorales importantes basados en la amplificación de actividad citolítica por linfocitos T citotóxicos (CTL), diferenciación Th1, activación de células NK (21), e inhibición de la vascularización tumoral (24). Desafortunadamente los primeros intentos para 25 probar la IL-12 recombinante purificada en clínica fracasaron debido a toxicidad dosis-dependiente (25,26).

### Descripción

30 Para estudiar los efectos antitumorales in-vivo de IP-10 y su combinación con IL-12, hemos optado por la transferencia génica mediada por adenovirus recombinantes defectivos. Para ello hemos generado un adenovirus

- 3 -

recombinante defectivo que expresa la proteína IP-10 murina (mIP-10), AdCMVIP-10, mediante el sistema Cre-lox(27), y empleado un adenovirus recombinante defectivo que expresa IL-12 murina (AdCMVIL-12) y un adenovirus recombinante defectivo que expresa el gen de la β-galactosidasa como adenovirus control, ambos generados en nuestro laboratorio anteriormente (28,29). En los tres adenovirus citados el transgén está bajo control del promotor del Citomegalovirus (CMV). Como ejemplo de modelo tumoral in-vivo hemos utilizado la inyección subcutánea de células CT26 (línea celular de adeno-carcinoma de colon inducida por el carcinógeno N-nitroso-N-metiluretano en ratones BALB/c (H-2<sup>d</sup>) (30). Hemos demostrado experimentalmente que a resultas de un efecto sinérgico de la expresión combinada de los genes IP-10 e IL-12 transferidos a las células malignas mediante adenovirus recombinantes ocurre el rechazo de nódulos tumorales por un mecanismo inmunológico, de suerte que el efecto resultante de la combinación es cuantitativa y cualitativamente distinto del obtenido con la transferencia génica de IP-10 o IL-12 por separado.

#### Descripción detallada de la invención

##### 20 Cultivos celulares

La línea celular 293 (células embrionarias de riñón humano transfectadas de forma estable con la región E1 perteneciente al adenovirus humano tipo 5, ECACC Nº 85120602) permite que los adenovirus empleados, defectivos para esta región del genoma adenoviral, puedan replicarse en el interior de las células 293. La línea celular HepG2 es una línea de hepatoblastoma humano. La línea celular Cre8, derivada de 293, posee un casete de expresión basado en el promotor del gen de la β-actina que controla el gen de la recombinasa Cre con una señal de localización nuclear N-terminal integrado establemente en la línea celular 293, y fue cedida por el Dr. S. Hardy (Universidad de California, San Francisco, USA). El medio de cultivo empleado para crecer estas líneas celulares fue DMEM completo (suplementado con suero de ternera fetal al 10 %

- 4 -

(FCS) inactivado a 56°C, glutamina 2 mM, estreptomicina 100 U/ml, penicilina 100 mg/ml). La línea celular CT26, gentilmente cedida por el Dr. K. Brand, Max-Planck-Institut fur Biochemie, Alemania, deriva de un adenocarcinoma colorectal de ratón BALB/c y fue inducida por el carcinógeno N-nitroso-N-metil-uretano. La 5 línea celular YAC-1 (ATCC) deriva de un linfoma inducido por el virus transformado de la leucemia Moloney de un ratón A/Sn. La línea de mastocitoma humano P815 (H-2<sup>d</sup>) fue obtenida a través de la ATCC. Estas líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 completo (suplementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS) inactivado a 56°C, glutamina 2 mM, 10 estreptomicina 100 U/ml, penicilina 100 mg/ml).

Las células descritas fueron cultivadas en cámaras incubadoras humidificadas a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

Los reactivos para los cultivos celulares son de Gibco (Basilea, Suiza), y las placas de cultivo son de Greiner Labortechnik (Frickenhausen, Alemania) y 15 TPP (Trasadingen, Suiza).

#### Animales empleados

En los estudios realizados se utilizaron ratones hembras BALB/c de entre 20 5 y 8 semanas (Charles Rives, Barcelona). Durante el período de experimentación los animales fueron mantenidos en el animalario del Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada (CIFA) de la Universidad de Navarra de acuerdo con las normas que rigen en la institución.

25 Construcción de un adenovirus que expresa mIP-10, AdCMVIP-10

Para la construcción de un adenovirus recombinante que exprese el gen murino IP-10 bajo control del promotor eucariótico del Citomegalovirus se utilizó el sistema Crelox (27). Células de bazo obtenidas de una ratona BALB/c de 8 semanas de edad se cultivaron in-vitro con medio RPMI completo en una placa 30 de 10 cm de diámetro (TPP, Trasadingen, Suiza) y se estimularon durante 3 horas con lipopolisacárido a una concentración de 20 ng/ml (SIGMA, Madrid, España) mantenidas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

- 5 -

A continuación se extrajo y purificó el ARN total de dichas células con la solución desnaturalizante de proteínas Ultraspect™ (Biotecx Inc., Houston, TX, USA) seguida del método de Chomcznski y Sacchi (31). A partir de una muestra de 1 $\mu$ g de dicho RNA se realizo la técnica de transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando un termociclador (Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 2400) para obtener y amplificar el ADN complementario (cADN) de mIP-10. El ARN total fue transcrit (60 minutos a 37°C) con 400 unidades de M-MuLV transcriptasa reversa (Gibco-BRL, Gaithersburg, Md, USA) en un volumen final de 40  $\mu$ l de solución salina 5x (250mM Tris-HCl pH 5, 8,3, 374 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), suplementado con 5mM DTT, 0,5mM desoxirribonucleótidos trifosfato (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), 48 unidades de inhibidores de ARNsas (Promega Co., MD, USA) y 400 ng de hexámeros aleatorios (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Después de desnaturizar la transcriptasa reversa (95°C, 1 minuto), una alícuota de 20  $\mu$ l (1 $\mu$ g) del cADN fue utilizada para la amplificación de IP-10 murino por PCR en 60  $\mu$ l de buffer de PCR (160nM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% v/v Tween 20) suplementado con 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 unidades de Biotaq™ ADN polimerasa (Bioline, Londres, UK) y 1 $\mu$ l 10mM de cebadores sentido y antisentido específicos de mIP-10: SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO: 2.

La amplificación de cADN de mIP-10 se realizó con 25 ciclos (94°C, 64°C y 72°C durante 45 segundos por cada temperatura). 40  $\mu$ l del producto de PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (p/v)teñido con bromuro de etidio. La banda obtenida se visualizó con una lámpara de luz ultravioleta, se cortó y extraído del gel, y el producto de la PCR se purificó mediante el kit de purificación de ADN, Ultrafree-DA (Amicon-Milipore, Madrid, España). El fragmento de 311 pares de bases correspondiente al cADN de mIP-10 se clonó en el plásmido pGEM-T utilizando el PGEM-T vector system (Promega Co. WI, USA) mediante una reacción de ligación a 14°C durante 12 horas empleando una T4 ADN ligasa (Roche Diagnostics, Barcelona, España).

Con el resultado de dicha ligación se transformaron bacterias competentes E. coli XL1-Blue Stratagen, La Jolla, Ca, USA) las bacterias transformadas se seleccionaron por su crecimiento en placas de Petri con medio LB con

- 6 -

ampicilina, ya que el vector contiene un gen de resistencia a este antibiótico. Se extrajo el ADN plasmídico de las bacterias positivas mediante la técnica de MiniPrep (Qiagen, Alemania) para, posteriormente, digerir 2 $\mu$ g de dicho plásmido con las enzimas SphI/Sall (Roche Diagnostics) y separar por electroforesis el resultado de dicha digestión en un gel de agarosa al 1,5% para comprobar la presencia del inserto. Los plásmidos con el fragmento de 311 pares de bases esperado se secuenciaron para descartar errores en la amplificación en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, Foster, CA, USA), utilizando el kit de secuenciación Dye Rhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer). El fragmento del plásmido PGEM-T/mIP-10 conteniendo el cADN de mIP-10 con la secuencia SEQ ID NO: 3 coincidió con las secuencias SEQ ID NO: 4 y 5 descritas en la bibliografía (3, 4). Dicho fragmento se escindió mediante una digestión con las enzimas de restricción SphI/Sall (Roche Diagnostics), el producto de la digestión se analizó en un gel de agarosa al 1,5%, la banda conteniendo el fragmento con el cADN de mIP-10 se purificó con el Kit de purificación de ADN Ultrafree-DA (Amicon-Milipore). Los extremos se completaron mediante la enzima Klenow (Roche Diagnostics) y se subclonó en el plásmido pAdLox, previamente abierto con la enzima Bgl II (Roche Diagnostics) y tratado con fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics), mediante una ligación a 14°C durante 16 horas con la misma enzima y condiciones que en el caso anterior. Con el resultado se transformaron bacterias competentes E. coli DH-5 $\alpha$  (Clontech, Palo Alto, CA, USA) se seleccionaron las resistentes a ampicilina y purificó el ADN plasmídico de colonias seccionadas siguiendo las técnicas descritas anteriormente. Se realizó un screening mediante una digestión con las enzimas de restricción Ncol y SmaI (Roche Diagnostics) y el producto se separó en un gel de agarosa al 1,5% para comprobar la presencia y orientación del inserto (cADN de IP-10 murino).

El plásmido obtenido, pAdlox/mIP10, contiene un casete de expresión con mIP-10 bajo el control del promotor CMV seguido de la señal de poliadenilación (poliA), precedido por la secuencia de encapsidación del adenovirus tipo 5 humano. Una vez purificado, el plásmido pAdlox/mIP-10 se cotransfектó en células Cre8 junto con el genoma purificado del adenovirus

- 7 -

recombinante defectivo ψ5 (figura 1A), de acuerdo con los métodos utilizados por Hardy et al. (30), para generar un adenovirus recombinante defectivo que contenga el gen de mIP-10, AdCMVIP-10 (figura 1A). El sobrenadante resultado de dicha cotransfección se amplificó y analizó para comprobar la presencia de mIP-10 y descartar contaminación residual con el virus ψ5 según las técnicas descritas y empleadas por los mismos autores (30,32).

La técnica RT-PCR fue utilizada para clonar el cADN del gen IP-10 murino a partir de células de bazo de una ratona BALB/c estimuladas con LPS. El cADN de mIP-10 fue subclonado a continuación del promotor eucariótico CMV y precediendo a una señal poliA en plásmido Padlox que contiene la señal de empaquetamiento adenoviral ψ y una región lox-P, todo el conjunto está flanqueado por los ITR adenovirales. El adenovirus recombinante AdCMVIP-10 fue generado mediante la co-transfección del plásmido Padlox/IP-10 y el genoma del virus ψ5 (adenovirus defectivo en E1 y E3) en la línea celular 293 que expresa la recombinasa CRE (CRE8). La recombinación a nivel de los sitios loxP catalizada por la recombinasa Cre dirige la generación de AdCMVIP-10.

#### Preparación del lote de adenovirus recombinante de trabajo.

El medio sobrenadante obtenido, conteniendo AdCMVIP-10, se utilizó para amplificar el virus. Con 3ml de dicho sobrenadante por placa, se infectaron células 293 cultivadas en placas de 150 mm de diámetro (entre 20 y 40 placas) a una confluencia del 80% durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las células presentaron efecto citopático (2-4 días) fueron recolectadas y centrifugadas a 1500 r.p.m. durante 10 min a 4°C, resuspendidas en Tris (pH 8) 0.1 M (18ml) y almacenadas a -80°C hasta el proceso de purificación del virus.

#### Purificación del adenovirus.

El adenovirus, AdCMVIP-10, producido se purificó mediante dos centrifugaciones en gradientes de cloruro de cesio y posterior dialisis del lisado de las células previamente infectadas. Las células infectadas con AdCMVIP-10 almacenadas se descongelaron y resuspendieron en 18-20 ml de Tris 0,01M (pH 7,4) con deoxicolato sódico (SDS) al 10% en una proporción 10/1 (v/v)

- 8 -

durante 30 minutos a temperatura ambiente, este procedimiento se emplea para lisar las células. La solución obtenida se sometió a un proceso de homogeneizado con un homogeneizador manual de cristal preenfriado, el proceso se realizó durante 5-10 minutos en hielo, una vez terminado el proceso, 5 se obtiene una solución homogénea en la que las células quedan totalmente disgregadas y el virus queda liberado del interior celular. A la suspensión con el virus y restos celulares resultante se le añadieron 5,8 ml de una solución saturada de cloruro de cesio por cada 10 ml de suspensión viral. Esta mezcla se distribuyó en tubos de polihalómero para centrifugación Quick-seal (Beckman Instruments, Ca, USA), los tubos fueron equilibrados con una error de  $\pm 0,5\text{mg}$  y sellados con calor. Los tubos fueron centrifugados durante 21 horas a 35.000 r.p.m. a 4°C en un rotor de ángulo fijo Beckman 50Ti en una ultracentrifugadora Beckman. Tras la centrifugación los tubos se extrajeron y la banda conteniendo el virus (la banda tiene una densidad aproximada de 1,35gr/ml) fue extraída con 10 una jeringa de 10ml atravesando el tubo desde una zona inferior a la banda. Las bandas de los diferentes tubos se añadieron a otro tubo Quick-seal con una solución de cloruro de cesio saturada, de forma que el gradiente de densidad final abarcara desde 1,25gr/ml hasta 1,4gr/ml, y se sometió a una centrifugación idéntica a la anterior. La nueva banda obtenida se extrajo de la forma indicada y 15 se dializó frente a 1 litro de solución Tris 0,01 M (pH 8) durante 1-2 horas a 4°C en agitación por dos veces, este proceso permite eliminar los restos de cloruro de cesio tóxico para las células. A la solución de AdCMVIP-10 concentrada se le añadió glicerol estéril (ICN, USA) como protector criogénico hasta una concentración final del 0,5% (v/v), alicuotada en tubos de 1ml (Costar) y 20 almacenados a -80°C.

25

#### Determinación del título infectivo del adenovirus.

Para determinar el título infectivo (unidades formadoras de placa, ufp) de la solución de AdCMVIP-10 producida se empleó el método de dilución límite en 30 placas de 96 pocillos (TPP) con células 293 (32). Con este sistema se infectan células 293 ( $10^4$  células por pocillo) con diluciones seriadas de la solución viral

- 9 -

para determinar la máxima dilución capaz de producir efecto citopático. La titulación se realiza por triplicado para cada virus. Los títulos obtenidos fueron:

- AdCMVIP-10:  $3,2 \times 10^{12}$  ufp/ml  
AdCMVIL-12:  $4,2 \times 10^{12}$  ufp/ml  
5 AdCMVLacZ:  $2,11 \times 10^{12}$  ufp/ml

Análisis por Western Blot de la proteína expresada por AdCMVIP-10.

La expresión y secreción de mIP-10 por AdCMVIP-10 se analizó mediante un ensayo de Western Blot a partir del sobrenadante de células HepG2 infectadas con dicho adenovirus. Células HepG2 cultivadas en placas de 10 cm de diámetro y a una confluencia del 75-80% se infectaron con AdCMVIP-10 (MOI: 65) durante 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, bien se transfecaron con Padlox/IP-10 con Fugene™ (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante o se dejaron sin infectar (control negativo), las 3 placas se mantuvieron con 2ml de medio 1640 sin suero durante 36 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los sobrenadantes con la proteína expresada se recogieron y concentraron usando Centricom YM-3 (Amicon, Milipore Co.). Las proteínas de las muestras se separaron por SDS-PAGE al 15% usando una solución tampón Tris/Tricina (33) de acuerdo con el método de Laemmli (34) y se transfirieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a una membrana Hybond-P (Amersham-Pharmacia Biotech Inc., Madrid España), que se bloqueó en PBS con un 0,1% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) y un 5% (p/v) de leche desnatada (Nestlé, Barcelona, España) a 4°C durante 16 horas. Despues de lavar la membrana 5 veces durante 3 minutos en agitación con 60 ml de PBS-T, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1/1000 de anticuerpo IgG policlonal de cabra frente a IP-10 de ratón (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA) en PBS (Sigma) con un 0,01% de Tween 20 (Sigma) (PBS-T) y un 1% de leche desnatada (Nestlé). La membrana fue lavada de la forma citada anteriormente e incubada con una dilución 1/5000 de anticuerpo de burro frente a IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnologies Inc.) durante 1 hora a temperatura ambiente y lavada de la misma manera. Las membranas se revelaron con el kit de detección ECL Plus.

- 10 -

de Amersham-Pharmacia de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los resultados (figura 1B) muestran que la infección de células HepG2 con AdCMVIP-10 da lugar a la expresión de mIP-10 y su liberación al medio sobrenadante que es detectado con anticuerpos policlonales frente a mIP-10 (calle 3). También es posible detectar mIP-10 tras la transfección, mediante complejos de liposomas, del plásmido Padlox/IP-10 (calle 4). La proteína no es detectada en células no infectadas (calle 1). 10 ng de IP-10 recombinante de ratón (R&D Systems, MN, USA) se emplearon como control positivo (calle 2).

10 Análisis de la biofuncionalidad de mIP-10 expresado por AdCMVIP-10.

Los ensayos de migración de células a través de una membrana permiten evaluar la capacidad quimiotáctica de una substancia. Para verificar que la proteína expresada por AdCMVIP-10 es biológicamente activa, se realizaron ensayos de migración de células T activadas, a través de membranas de policarbonato, en respuesta a sobrenadantes de células HepG2 infectadas con AdCMVIP-10. Células de bazo obtenidas de ratones BALB/c se cultivaron en placas de cultivo de 10 cm de diámetro durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con medio RPMI 1640 completo. Tras este periodo de tiempo se recogió el medio que contiene las células de bazo no adherentes, esta suspensión de células se hizo pasar por columnas de lana de nylon siguiendo el protocolo que aparece publicado en Current Protocols in Immunology (Wisley, USA) de forma que la solución final obtenida solo contiene linfocitos T y células NK. Estas células T se cultivaron con RPMI1640 completo suplementado con IL-2 (20 IU/ml) (Peprotech) y activadas mediante la adición al medio de cultivo de 2 µg/ml de Con A (SIGMA), tras 2 días las células se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio RPMI 1640 al 0,5% de suero de ternera fetal y una concentración de 6x10<sup>6</sup> células/ml. Células HepG2 al 70-80% en placas de 10 cm de diámetro se infectaron a una MOI= 65 con AdCMVLacZ, AdCMVIP-10 o se mantuvieron sin infectar en medio RPMI 1640 al 0,5% de suero de ternera fetal. A las 48 horas se recogió el medio de las células infectadas y no infectadas. Los ensayos de migración se realizaron en cámaras de cultivo Transwell cell culture chambers (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) a través

- 11 -

de membranas de policarbonato de 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, 10  $\mu\text{m}$  de grosor, y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro siguiendo el protocolo descrito por Vicente-Manzanares et al. (35). En la cámara superior de cada pocillo se depositaron las células T activadas (100  $\mu\text{l}$  a  $6 \times 10^6$  células/ml) y en la cámara inferior los diferentes sobrenadantes obtenidos, IP-10 recombinante de ratón (100 ng/ml) o sobrenadante de células infectadas con AdCMVIP-10 con anticuerpos monoclonales neutralizante frente a IP-10 de ratón (R&D) (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). El ensayo se mantuvo durante 2 horas a 37°C y en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Las membranas se fijaron en una disolución al 1% (v/v) de glutaraldehido en PBS durante 1 hora y teñidos, a continuación, en azul de toluidina al 0.5% (p/v) en una solución de EtOH al 30% (v/v) en PBS. La cuantificación de células T que migran se lleva a cabo contando el número de células adheridas a la cara inferior de las membranas de policarbonato; se contaron 10 campos microscópicos por pocillo. El experimento se realizó por triplicado.

Como se muestra en la figura 2 el número de células T activadas atraídas por los sobrenadantes de células infectadas con AdCMVIP-10 fue significativamente mayor que en los grupos control. Este efecto es neutralizado cuando se añade anticuerpo monoclonal frente a mIP-10 y no se aprecia en los sobrenadantes de células infectadas con AdCMVLacZ. Las diferencias significativas con una  $p < 0.01$  de acuerdo con el test de Mann-Whitney con ajuste de Bonferroni se indican con \*\*.

#### Tratamiento in-vivo de tumores establecidos con AdCMVIP-10.

Para analizar la eficacia antitumoral de la transferencia génica de IP-10 mediante AdCMVIP-10 se establecieron tumores mediante la inyección subcutánea, con jeringas de insulina (Becton-Dickinson, España), de  $5 \times 10^5$  células de adenocarcinoma de colon CT26 resuspendidas en 50  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS) en el flanco derecho de ratones singénicos BALB/c. Después de 10 días, cuando los tumores alcanzaron un diámetro medio de 5-8mm, se dividieron aleatoriamente los animales en grupos y fueron tratados con  $10^9$  ufp de AdCMVIP-10 en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS),  $10^9$  ufp de adenovirus control (AdCMVLacZ) diluido en 50  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS) o con

- 12 -

50 µl de solución salina (PBS) mediante su inyección intratumoral con una jeringa de precisión de 50µl Hamilton. El crecimiento de los tumores fue monitorizado durante más de 60 días midiendo dos diámetros perpendiculares del tumor empleando un calibrador de precisión. Aquellos animales con tumores  
5 que sobrepasaron 1.5 cm en ambos diámetros tumorales o 2 cm en uno de sus diámetros fueron sacrificados por razones éticas reguladas institucionalmente y se consideró como muerte del animal. La inyección intratumoral de AdCMVIP-10 indujo la regresión tumoral completa en dos de los catorce ratones tratados y se apreció un leve retraso en el crecimiento de algunos tumores en  
10 comparación con los animales que recibieron suero salino o AdCMVLacZ, todos los tumores terminaron causando la muerte de los ratones en estos dos grupos. En la figura 3 se puede apreciar el seguimiento individual del diámetro tumoral medio de los animales de cada grupo.

15 Tratamiento in-vivo de tumores establecidos mediante la combinación AdCMVIP-10 + AdCMVIL-12

Se ha descrito por los inventores de esta patente un potente efecto terapéutico antitumoral con la transferencia génica de la IL-12 mediante AdCMVIL-12 frente a adenocarcinoma de colon derivado de células CT26  
20 empleando dosis de  $10^9$  ufp y  $10^8$  ufp(36,37). Bajo estas condiciones, la inyección intratumoral de AdCMVIL-12 permite la erradicación tumoral en un 60-80% de los casos. Con vistas a evaluar la eficacia antitumoral de la combinación de la transferencia génica de IP-10 e IL-12 se probó la eficacia antitumoral de la inyección de AdCMVIP-10 con dosis subterapéuticas de AdCMVIL-12 de forma  
25 que la sinergia entre ambas sustancias fuera más evidente. Para ello se establecieron tumores mediante la inyección subcutánea de  $5 \times 10^5$  células de adenocarcinoma de colon CT26 resuspendidas en 50 µl de solución salina (PBS) en el flanco derecho de ratones singénicos BALB/c. Después de 10 días, cuando los tumores alcanzaron un diámetro medio de 5-8mm, se dividieron los  
30 animales en grupos y fueron tratados con:  
-  $7,5 \times 10^7$  ufp de AdCMVIL-12 en un volumen de 50 µl de solución salina (PBS),

- 13 -

- $5 \times 10^8$  ufp de AdCMVIP-10 +  $7,5 \times 10^7$  ufp de AdCMVLacZ en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS)
  - $7,5 \times 10^7$  ufp de AdCMVIL-12 +  $5 \times 10^8$  ufp de AdCMVLacZ en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS)
- 5 -  $5 \times 10^8$  ufp de AdCMVIP-10 +  $7,5 \times 10^7$  ufp de AdCMVIL-12 en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS)
- $5 \times 10^8$  ufp de AdCMVIP-10 +  $5 \times 10^7$  ufp de AdCMVIL-12 en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS)
  - o con 50  $\mu\text{l}$  de solución salina PBS
- 10 Los resultados obtenidos, figura 4, demuestran que con la dosis subterapéutica de AdCMVIL-12 ( $7,5 \times 10^7$  ufp) sólo se consiguió la desaparición tumoral en 4 de 11 ratones tratados y al retraso del crecimiento tumoral en algunos casos. Por contra, la inyección intratumoral con una combinación de AdCMVIP-10 + AdCMVIL-12 resultó en la regresión tumoral de todos los
- 15 tumores tratados con las dos dosis de AdCMVIL-12 utilizadas,  $7,5 \times 10^7$  ufp (10 de 10) y  $5 \times 10^7$  ufp (5 de 5). Para descartar que estos resultados puedan estar relacionado con la combinación de dos adenovirus independientemente de los transgenes expresados, se trataron otros dos grupos de animales, uno con AdCMVIP-10 + AdCMVLacZ y otro con AdCMVIL-12 + AdCMVLacZ en sus
- 20 dosis correspondientes (figura 4). En el grupo de animales tratados con la combinación AdCMVIP-10 + AdCMVLacZ no se produjo ningún rechazo tumoral, tan solo un retraso en el crecimiento tumoral en 3 de 10 casos. En el grupo de animales tratados con AdCMVIL-12 + AdCMVLacZ se obtuvo una regresión tumoral en el 40% de los casos (2 de 5) en concordancia con los
- 25 resultados obtenidos con la inyección de AdCMVIL-12 a la misma dosis. Estos datos demuestran que la combinación de la transferencia génica de IP-10 en combinación con la transferencia génica de IL-12 tiene como resultado una respuesta antitumoral muy importante que permite alcanzar el 100% de erradicación tumoral en este modelo, y que la administración de IP-10 potencia
- 30 significativamente el efecto antitumoral de la IL-12.

- 14 -

Efecto a distancia de la combinación IP-10 + IL-12.

Para comprobar si la combinación IP-10+ IL-12 permite obtener la misma eficacia antitumoral en tumores distantes no tratados, se desarrolló otro modelo experimental mediante la inoculación bilateral de  $5 \times 10^5$  células CT26 resuspendidas en 50  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS) en ambas regiones dorsolaterales, con el objeto de obtener dos tumores de manera simultánea. Dicho modelo reproduce la situación de un adenocarcinoma diseminado. Cuando estos nódulos tumorales alcanzaron un diámetro aproximado de 5-6 mm, se dividieron en grupos, se procedió a la administración intratumoral, en el tumor del lado derecho del animal, de AdCMVIL-12 ( $7,5 \times 10^7$  ufp), AdCMVIP10 ( $5 \times 10^8$  ufp) + AdCMVIL-12 ( $7,5 \times 10^7$  ufp) o solución salina y solución salina en todos los tumores del flanco izquierdo, el volumen inoculado fue 50 $\mu\text{l}$  en todos los tumores. Tras el tratamiento, los tumores fueron medidos dos veces por semana, durante 90 días, para evaluar la regresión tumoral. Como se puede observar en la Tabla I, todos los ratones tratados con la combinación IP-10 + IL-12 (6 de 6) rechazaron tanto los tumores tratados como los no tratados. Sin embargo en el grupo de ratones tratados con  $7,5 \times 10^7$  ufp de AdCMVIL-12 en el tumor derecho solo se produjo una remisión tumoral completa en dicho tumor tratado (1 de 6) y ninguna en los nódulos distantes. En el grupo control tratado con PBS no se observó ningún rechazo tumoral. Podemos afirmar que la combinación de IP-10 + IL-12 permite obtener un potente efecto terapéutico frente a nódulos tumorales distantes no tratados directamente lo que constituye una valiosa herramienta en el tratamiento de la enfermedad metastásica diseminada.

25

La transferencia génica de IP-10 e IL-12 tiene un efecto sinérgico en la inducción de actividad citotóxica específica frente al tumor.

Se ha demostrado que la transferencia génica de IL-12 induce la activación de una respuesta citotóxica frente a las células tumorales (36,37). 30 Para comprobar si la combinación de IP-10 + IL-12 permite aumentar dicha respuesta se realizaron los siguientes experimentos. Ratones con tumores subcutáneos inducidos mediante la inyección de  $5 \times 10^5$  células CT26 en 50  $\mu\text{l}$  de

- 15 -

solución salina en el flanco derecho fueron tratados, 10 días después de dicha inducción, con diferentes combinaciones de adenovirus (2-3 ratones por grupo):  
-  $7,5 \times 10^7$  ufp de AdCMVIL-12 en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS),  
-  $5 \times 10^8$  ufp de AdCMVIP-10 +  $7,5 \times 10^7$  ufp de AdCMVIL-12 en un volumen de 50  
5  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS)  
-  $5 \times 10^8$  ufp de AdCMVIP-10 en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de solución salina (PBS)  
15 días después del tratamiento los bazo de estos animales y sus células utilizadas para medir la inducción de actividad citotóxica específica frente a células CT26. Para ello los bazo de cada grupo de animales se disgregaron  
10 mediante el empleo de dos portas de vidrio esmerilado. A continuación se lisaron los glóbulos rojos mediante la suspensión celular en 2 ml de solución tampón de lisis ACK (PBS con 0,83% (p/v) de  $(\text{NH}_4)\text{KCl}_2$ ). El homogeneizado de células de bazo se lavó mediante 3 centrifugaciones de 7 minutos a 340 g en un tubo de 50ml con 30 ml de medio RPMI 1640 limpio por lavado. A  
15 continuación se procedió a la re-estimulación de las células durante 6-7 días en placas de 24 pocillos cultivas con medio RPMI1640 completo. En cada pocillo se re-estimularon  $7-8 \times 10^6$  células de bazo con  $7-8 \times 10^5$  células CT26 tratadas previamente, para inhibir su crecimiento, con 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Mitomicina C (Sigma, Madrid, España) durante 1 hora a 37°C. Después de 6-7 días de re-estimulación  
20 se midió la actividad citotóxica de las células re-estimuladas mediante un ensayo de liberación del isótopo radioactivo Cr<sup>51</sup>, previamente cargado en las células diana. Cuando las células diana son lisadas por las células T citotóxicas específicas frente a los antígenos que dicha célula diana presenta asociados a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I (38) las  
25 células liberan el isótopo radioactivo intracelular. Para su marcaje las células CT26 diana fueron incubadas con 100  $\mu\text{Ci}$  de Na<sub>2</sub>Cr<sup>51</sup>O<sub>4</sub> por cada  $10^6$  células durante 1 hora a 37°C. Después de la captación de esta sal de Cr<sup>51</sup> radioactivo las células se lavaron mediante 3 centrifugaciones de 5 minutos a 280 g en un tubo de 50ml con 30 ml de medio RPMI 1640 limpio por centrifugación. Las  
30 células diana se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/ml y se sembraron 100  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$  de esta suspensión en placas de 96 pocillos ( $5 \times 10^3$  células/pocillo). A continuación se añadieron

- 16 -

diferentes cantidades de células T citotóxicas efectoras por pocillo de forma que las pro-porciones finales célula efectora/célula diana (E:D) fueron 100:1, 33:1, 11:1 por cada grupo de tratamiento. En cada experimento se sembraron tres replicas por tratamiento y proporción E:D. Las células diana incubadas junto con 5 las efectoras se incubaron durante 5 horas a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>, después se recogieron 50μl de medio sobrenadante de cada pocillo y se midió la radioactividad (cuentas por minuto, cpm) en un contador estándar de radiación-γ (Packard). Se determinó la liberación espontánea de Cr<sup>51</sup> a partir de células diana cultivadas en ausencia de células efectoras en un mismo volumen 10 final de medio e incubadas en las mismas condiciones y la liberación máxima de Cr<sup>51</sup> a partir de células diana en las mismas condiciones que las anteriores, pero incubadas con un detergente que las lisa liberando todo el Cr<sup>51</sup> captado (Triton-X al 0.8%). El porcentaje de lisis celular específica se calculó empleando la siguiente fórmula matemática:

15 % de lisis = 100x (cpm muestra – cpm espontánea)/(cpm máxima – cpm espontánea).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5A, se observa que la combinación de la transferencia génica de IP-10 + IL-12 induce la generación de una actividad citotóxica que ronda el 60% cuando se aplica un ratio E:D de 100 20 a 1. Sin embargo, la transferencia génica de IL-12 o IP-10 de forma independiente, en las mismas dosis que cuando son combinados, inducen tan solo niveles del 7-9% con un ratio de 100 a 1. La combinación de IP-10+ IL-12 permite obtener una actividad citotóxica específica mucho mayor cuando son administradas de forma combinada que cuando cada sustancia es administrada 25 de forma aislada e individual.

Experimentos similares se llevaron a cabo para demostrar que la actividad citotóxica detectada es específica frente a células CT26. Células efectoras extraídas de bazos de animales con tumores similares tratados con 5x10<sup>8</sup> ufp de AdCMVIP-10 + 7,5x10<sup>7</sup> ufp de AdCMVIL-12 en un volumen de 50 μ 30 l de solución salina (PBS) se enfrentaron, en las mismas proporciones E:D, durante el mismo tiempo y mismas condiciones, frente a células P815, células P815 incubadas durante el ensayo con el péptido AH1, células P815 incubadas

- 17 -

durante el ensayo con el péptido P815AB y células YAC-1 todas ellas marcadas con Cr<sup>51</sup> de la forma descrita anteriormente. Los péptidos AH1 (SEQ ID NO: 6) (38) y P815AB (SEQ ID NO: 7) (39), restringidos a H-2L<sup>d</sup> fueron sintetizados siguiendo la técnica FMOC (40) y su pureza analizada por cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC). Los niveles de liberación de Cr<sup>51</sup> se realizaron de la misma manera que el experimento anterior. Los resultados (figura 5B) muestran que se detecta actividad citotóxica exclusivamente frente a las células P815 incubadas con el péptido AH1 (determinante antigénico específico de células CT26) mientras que frente al resto de células diana no se detecta actividad citotóxica. Con estos resultados queda demostrado que la actividad citotóxica inducida por la combinación IP-10 + IL-12 es específica frente al tumor tratado y se reconoce uno de los antígenos identificados en él (38) y presentado por la molécula del CMH-I H 2L<sup>d</sup>

Para estudiar la generación de inmunidad protectora frente a una nueva administración de células tumorales, se realizó la inoculación de 5 x 10<sup>5</sup> células CT26 en 50 ul de solución salina 2 meses después de la desaparición del primer tumor en 10 animales tratados con IP-10 + IL-12. Como grupo control se utilizaron animales sanos a los cuales se les inoculó la misma cantidad de células tumorales. En ninguno de los 10 ratones que previamente ya rechazaron el primer tumor se detectaron nódulo tumoral alguno. Todos los animales del grupo control desarrollaron tumores. Con este experimento queda demostrado el desarrollo de inmunidad sistémica protectora después de la transferencia génica de IP-10 e IL-12.

25     Descripción de las figuras

Figura 1A: Construcción del adenovirus recombinante defectivo que contiene el gen murino IP-10 (AdCMVIP-10).

Figura 1B: Análisis mediante la técnica de Western Blotting con un anticuerpo políclonal frente a la proteína murina IP-10 de sobrenadantes de células HepG2 no transfectadas (1), infectadas con AdCMVIP-10 a una MOI de 65 (3), trans-

- 18 -

fectadas con el plásmido pAdloxIP-10 (4) y proteína IP-10 recombinante de ratón como control positivo (2).

Figura 2: Ensayo de biofuncionalidad de IP-10 codificada por AdCMVIP-10  
5 mediante la cuantificación de la capacidad para atraer linfocitos T activados:

Ensayo de transmigración a través de una membrana de policarbonato con poros de 5 $\mu$ m de diámetro que separa dos cámaras, en la inferior se encuentra la sustancia quimiotáctica y en la superior blastos de células T activadas con ConA. La actividad quimiotáctica de proteína IP-10 recombinante (rIP-10) de ratón purificada a una concentración de 10ng/ml, sobrenadante de células HepG2 infectadas 48 horas antes con AdCMVLacZ, AdCMVIP-10 (con o sin anticuerpos neutralizantes anti IP+10 MAb) o células no infectadas, control (C) en abcisas, es cuantificada mediante el recuento por campo microscópico de blastos del número de células T estimuladas con Con-A adheridas a la cara inferior de la membrana (número células/campo (40x) en ordenadas).

Figura 3: Efectos de la inyección intratumoral con AdCMVIP-10.

Nódulos tumorales inducidos en ratones BALB/c mediante la inoculación subcutánea de  $5 \times 10^6$  células CT26 en el flanco derecho fueron inyectados intratumoralmente 9 días después con B) AdCMVIP-10 ( $10^9$  upf), C) AdCMVLacZ ( $10^9$  upf) o A) con solución salina (PBS), como control. La evolución individual (en días, abcisas) de los tumores fue evaluada midiendo dos diámetros perpendiculares. El valor representado en ordenadas es la media aritmética de ambos diámetros, en mm.

25

Figura 4: Combinación de AdCMVIP-10 e AdCMVIL-12.

Grupos de ratones con tumores subcutáneos de células CT26 recibieron una inyección intratumoral 9 días después de la inducción tumoral con los adenovirus: B) AdCMVIL-12, C) AdCMVIP-10 + AdCMVLacZ, D) AdCMVIP-10 +  
30 E) AdCMVIL-12 + AdCMVIL-12, F) AdCMVIP-10 + AdCMVIL-12 o A) solución salina. La evolución del diámetro tumoral fue monitorizada individualmente (días postratamiento en abcisas). Las dosis administradas y la

- 19 -

fracción de animales cuyos tumores fueron rechazados, -en quebrado y %- aparecen también indicados.

Figura 5: La transducción intratumoral con IP-10 e IL-12 permite aumentar los  
5 linfocitos T citotóxicos específicos frente al tumor

- A. Se extrajeron los bazos de ratones Balb/c con tumores subcutáneos de células CT26 tratados con los adenovirus indicados. Las células de dichos bazos fueron re-estimulados in-vitro durante 6 días con células CT26 tratadas con Mitomicina-C para, posteriormente, medir su actividad citotóxica frente a células CT26 mediante ensayos de liberación de Cr<sup>51</sup> de 5 horas de duración. Los datos representan en ordenadas la media de los niveles de lisis específica (%) ± EEM a diferentes proporciones de células efectoras frente a células diana (E:D), en abcisas, a partir de tres experimentos independientes.
- B. Células de bazo de ratones que rechazaron tumores de células CT26 después del tratamiento con AdCMVIP-10 y AdCMVIL-12 se cultivaron in-vitro durante 6 días con células CT26 tratadas con Mitomicina-C. Se estudio la actividad citotóxica de los linfocitos de dichos bazos frente a células P815, YAC-1, P815 + 10ng/ml de los octapéptidos indicados AH1 o P815AB (péptido control) mediante ensayos de liberación de Cr<sup>51</sup>. Los datos representan en ordenadas la media de lisis específica ± EEM de dos experimentos. Con respecto al ratio (E:D) en abcisas, de células efectoras frente a células diana.

Bibliografia

1. Luster, A. D., and J. V. Ravetch. 1987. Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. *Mol Cell Biol* 7:3723.
- 5 2. Farber, J. M. 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 61:246.
- 10 3. Ohmori, Y., and T. A. Hamilton. 1990. A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10. *Biochem Biophys Res Commun* 168:1261.
4. Vanguri, P., and J. M. Farber. 1990. Identification of CRG-2. An interferon-inducible mRNA predicted to encode a murine monokine. *J Biol Chem* 265:15049.
- 15 5. Loetscher, M., P. Loetscher, N. Brass, E. Meese, and B. Moser. 1998. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 28:3696.
- 20 6. Weng, Y., S. J. Siciliano, K. E. Waldburger, A. Sirotina-Meisher, M. J. Staruch, B. L. Daugherty, S. L. Gould, M. S. Springer, and J. A. DeMartino. 1998. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J Biol Chem* 273:18288.
- 25 7. Tamaru, M., Y. Tominaga, K. Yatsunami, and S. Narumi. 1998. Cloning of the murine interferon-inducible protein 10 (IP-10) receptor and its specific expression in lymphoid organs. *Biochem Biophys Res Commun* 251:41.
8. Taub, D. D., A. R. Lloyd, K. Conlon, J. M. Wang, J. R. Ortaldo, A. Harada, K. Matsushima, D. J. Kelvin, and J. J. Oppenheim. 1993. Recombinant human 30 interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T

- lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 177:1809.
9. Loetscher, P., M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996.  
5 Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release. *J Immunol* 156:322.
10. Taub, D. D., T. J. Sayers, C. R. Carter, and J. R. Ortaldo. 1995. Alpha and beta  
10 chemokines induce NK cell migration and enhance NK- mediated cytosis. *J Immunol* 155:3877.
11. Luster, A. D., and P. Leder. 1993. IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent  
thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 178:1057.
15. Sgadari, C., A. L. Angiolillo, B. W. Chemey, S. E. Pike, J. M. Farber, L. G.  
Koniaris, P. Vanguri, P. R. Burd, N. Sheikh, G. Gupta, J. Teruya-Feldstein, and G.  
Tosato. 1996. Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor  
necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13791.
20. Angiolillo, A. L., C. Sgadari, D. D. Taub, F. Liao, J. M. Farber, S. Maheshwari, H.  
Kleinman, G. H. Reaman, and G. Tosato. 1995. Human interferon-inducible  
protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182:155.
25. Angiolillo, A. L., C. Sgadari, and G. Tosato. 1996. A role for the interferon-  
inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Ann NY Acad  
Sci* 795:158.
30. Luster, A. D., S. M. Greenberg, and P. Leder. 1995. The IP-10 chemokine binds to a  
specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits  
endothelial cell proliferation. *J Exp Med* 182:219.

16. Kanegane, C., C. Sgadari, H. Kanegane, J. Teruya-Feldstein, L. Yao, G. Gupta, J. M. Farber, F. Liao, L. Liu, and G. Tosato. 1998. Contribution of the CXC chemokines IP-10 and Mig to the antitumor effects of IL-12. *J Leukoc Biol* 64:384.
- 5 17. Dilloo, D., K. Bacon, W. Holden, W. Zhong, S. Burdach, A. Zlotnik, and M. Brenner. 1996. Combined chemokine and cytokine gene transfer enhances antitumor immunity [see comments]. *Nat Med* 2:1090.
- 10 18. Maric, M., L. Chen, B. Sherry, and Y. Liu. 1997. A mechanism for selective recruitment of CD8 T cells into B7-1-transfected plasmacytoma: role of macrophage-inflammatory protein 1alpha. *J Immunol* 159:360.
- 15 19. Ramarathinam, L., M. Castle, Y. Wu, and Y. Liu. 1994. T cell costimulation by B7/BB1 induces CD8 T cell-dependent tumor rejection: an important role of B7/BB1 in the induction, recruitment, and effector function of antitumor T cells. *J Exp Med* 179:1205.
- 20 20. Emtage, P. C., Y. Wan, M. Hitt, F. L. Graham, W. J. Muller, A. Zlotnik, and J. Gauldie. 1999. Adenoviral vectors expressing lymphotactin and interleukin 2 or lymphotactin and interleukin 12 synergize to facilitate tumor regression in murine breast cancer models [see comments]. *Hum Gene Ther* 10:697.
- 25 21. Trinchieri, G. 1998. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 70:83.
22. Johnson, L. L., and P. C. Sayles. 1997. Interleukin-12, dendritic cells, and the initiation of host-protective mechanisms against *Toxoplasma gondii* [comment]. *J Exp Med* 186:1799.

- 23 -

23. Ma, X., M. Aste-Amezaga, G. Gri, F. Gerosa, and G. Trinchieri. 1997  
Immunomodulatory functions and molecular regulation of IL-12. *Chem Immunol*  
68:1.
- 5 24. Voest, E. E., B. M. Kenyon, M. S. O'Reilly, G. Truitt, R. J. D'Amato, and J.  
Folkman. 1995. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12 [see  
comments]. *J Natl Cancer Inst* 87:581.
- 10 25. Car, B. D., V. M. Eng, J. M. Lipman, and T. D. Anderson. 1999. The toxicology of  
interleukin-12: a review. *Toxicol Pathol* 27:58.
- 15 26. Lotze, M. T., L. Zitvogel, R. Campbell, P. D. Robbins, E. Elder, C. Haluszczak, D.  
Martin, T. L. Whiteside, W. J. Storkus, and H. Tahara. 1996. Cytokine gene therapy  
of cancer using interleukin-12: murine and clinical trials. *Ann N Y Acad Sci*  
795:440.
- 20 27. Hardy, S., M. Kitamura, T. Harris-Stansil, Y. Dai, and M. L. Phipps. 1997.  
Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* 71:1842.
28. Qian, C., M. Idoate, R. Bilbao, B. Sangro, O. Bruna, J. Vazquez, and J. Prieto. 1997.  
Gene transfer and therapy with adenoviral vector in rats with diethylnitrosamine-  
induced hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 8:349.
- 25 29. Qian, C., R. Bilbao, O. Bruna, and J. Prieto. 1995. Induction of sensitivity to  
ganciclovir in human hepatocellular carcinoma cells by adenovirus-mediated gene  
transfer of herpes simplex virus thymidine kinase. *Hepatology* 22:118.
- 30 30. Brattain, M. G., J. Stobel-Stevens, D. Fine, M. Webb, and A. M. Samif. 1980.  
Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic  
properties. *Cancer Res* 40:2142.

31. Chomczynsky P; Sacchi N. 1987. Single-step of RNA isolation by acid guanidin thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159
32. Hitt, M et al. 1995 In Methods in Molecular Genetics, ed. Adolph, KW Vol 7
- 5 33. Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368.
34. Laemmli, U.K. 1970. *Nature* 227: 680-685.
- 10 35. Vicente-Manzanares, M., M. C. Montoya, M. Mellado, J. M. Frade, M. A. del Pozo, M. Nieto, M. O. de Landazuri, A. C. Martinez, and F. Sanchez-Madrid. 1998. The chemokine SDF-1alpha triggers a chemotactic response and induces cell polarization in human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 28:2197.
- 15 36. Mazzolini G. et al. 1999. Regression of colon cancer and induction of antitumor immunity by intratumoral injection of adenovirus expressing interleukin-12. *Cancer Gene Ther.* 1999 Nov-Dec;6(6):514-22.
- 20 37. Mazzolini G. et al. 2000. Adenoviral gene transfer of interleukin 12 into tumors synergizes with adoptive T cell therapy both at the induction and effector level. *Hum Gene Ther.* Jan 1;11(1):113-25.
- 25 38. Huang, A. Y., P. H. Gulden, A. S. Woods, M. C. Thomas, C. D. Tong, W. Wang, V. H. Engelhard, G. Pasternack, R. Cotter, D. Hunt, D. M. Pardoll, and E. M. Jaffee. 1996. The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9730.
- 30

- 25 -

39. Van den Eynde, B., B. Lethe, A. Van Pel, E. De Plaen, and T. Boon. 1991. The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J Exp Med* 173:1373.

5

40. Borras-Cuesta, F., A. Petit-Camurdan, and Y. Fedon. 1987. Engineering of immunogenic peptides by co-linear synthesis of determinants recognized by B and T cells. *Eur J Immunol* 17:1213.

10

15

20

25

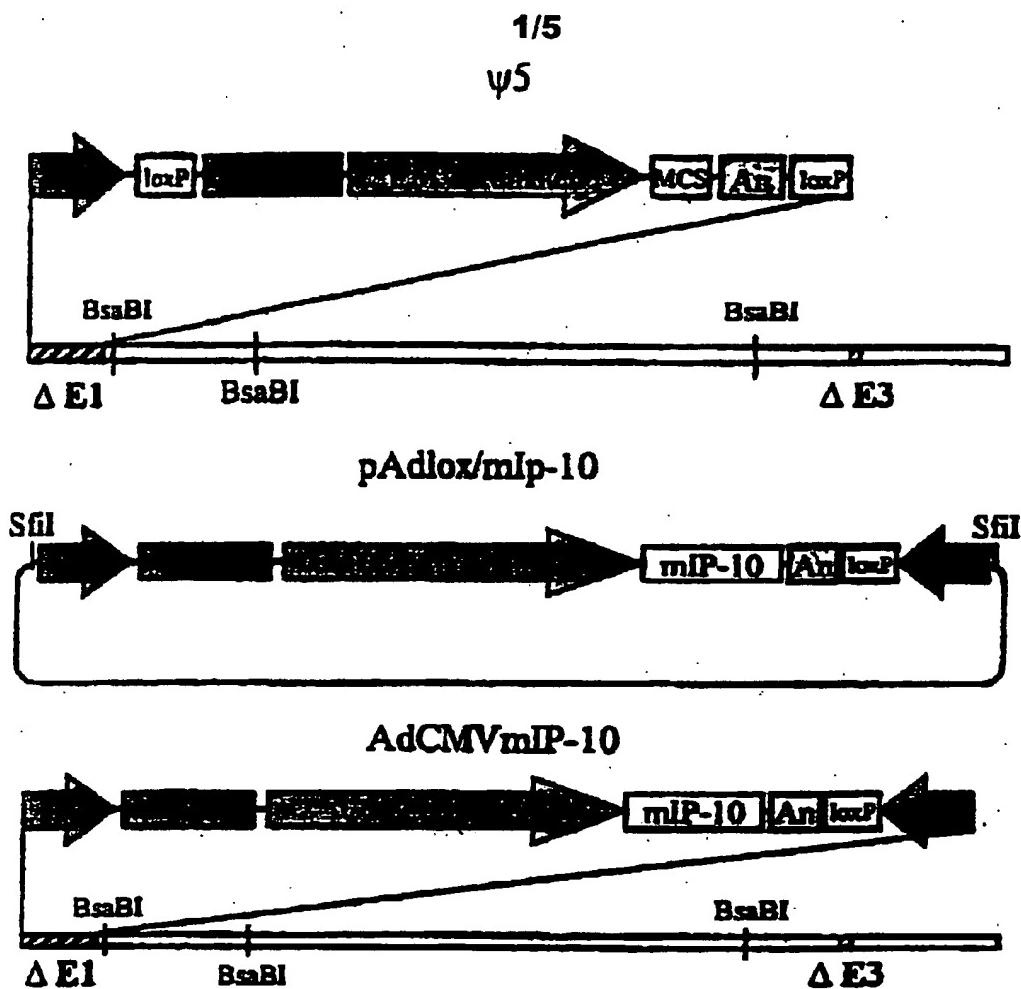
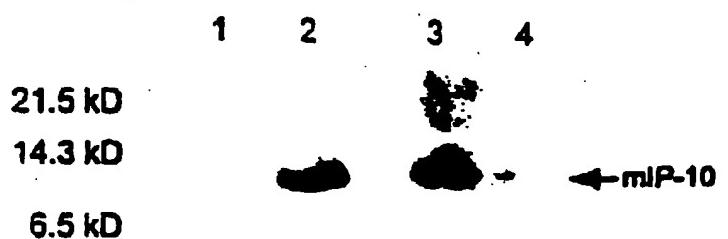
30

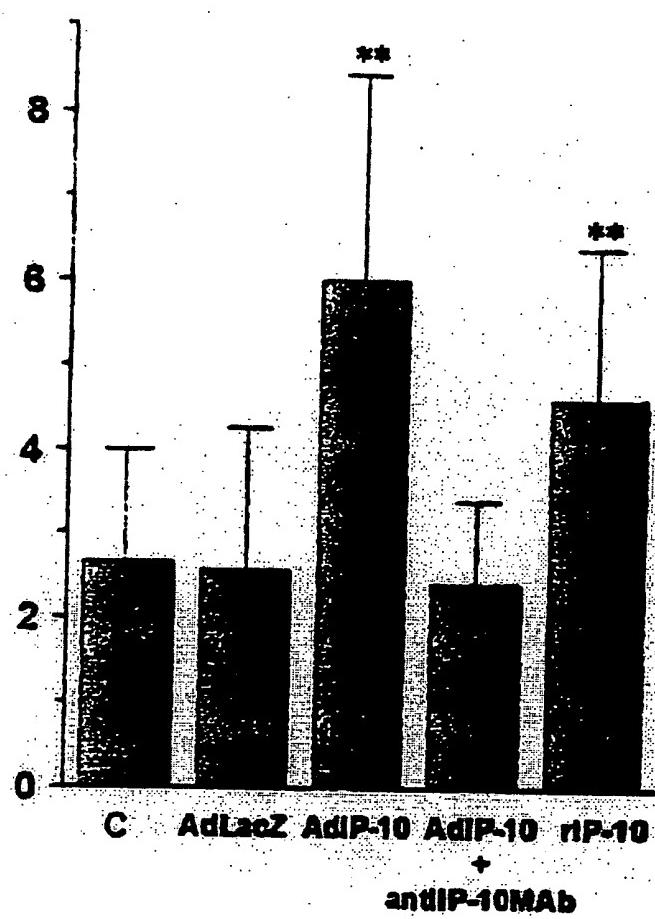
REIVINDICACIONES

1. Uso combinado de la proteína inducible por interferon gamma 10 (IP-10) y la interleucina 12 (IL-12) en la fabricación de composiciones útiles para el tratamiento de tumores malignos, particularmente del adenocarcinoma de colon metastásico.
2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la composición consiste en un sistema de expresión recombinante que expresa conjuntamente IP-10 y IL-12 fragmentos de las mismas que tengan el mismo efecto antitumoral.
3. Uso según la reivindicación 2, caracterizado porque el sistema de expresión recombinante consiste en un vector viral.
4. Uso según la reivindicación 3, caracterizado porque el vector viral consiste en un adenovirus, un virus adeno-asociado, un alfa virus, un herpesvirus o un lentivirus defectivo, o combinaciones de los mismos.
- 5.-Uso según la reivindicación 2, caracterizado porque el sistema de expresión recombinante consiste en un vector no viral.
6. Uso según la reivindicación 5, caracterizado porque el vector no viral consiste en un plásmido.
7. Uso según la reivindicación 2, caracterizado porque el sistema de expresión recombinante consiste en una molécula de ADN o ARN, o combinaciones de los mismos.
8. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la composición comprende las propias proteínas recombinantes IP-10 e IL-12 obtenidas in vitro o fragmentos de las mismas que tengan el mismo efecto antitumoral.
9. Uso combinado de la proteína inducible por interferon gamma 10 (IP-10) y la interleucina 12 (IL-12) en la preparación de composiciones útiles en la inducción de una respuesta citotóxica frente a antígenos o células tumorales.
10. Uso combinado de la proteína inducible por interferon gamma 10 (IP-10) y la interleucina 12 (IL-12) como adyuvante en composiciones inductoras de respuestas inmunitarias.

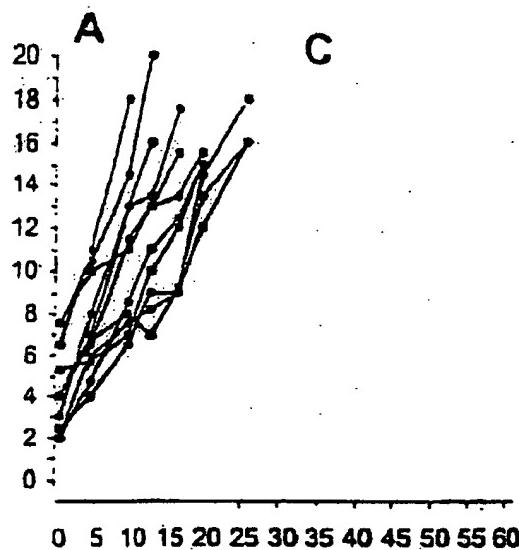
- 27 -

11. Uso según la reivindicación 9, caracterizado porque la composición consiste en una formulación de vacuna.
12. Uso de IP-10 en la preparación de composiciones que potencien el efecto antitumoral de IL-12 .

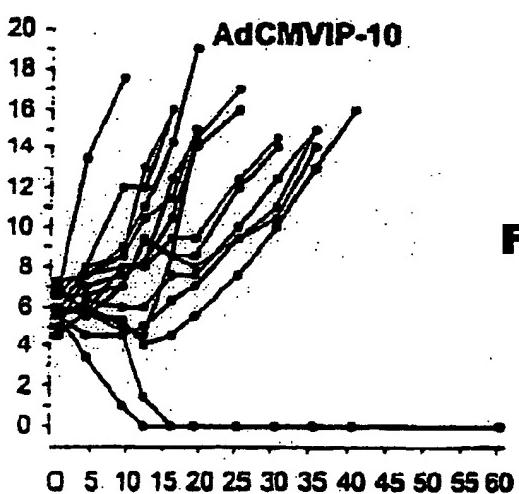
**FIGURA 1A****FIGURA 1B**

**2/5****FIGURA 2**

3/5

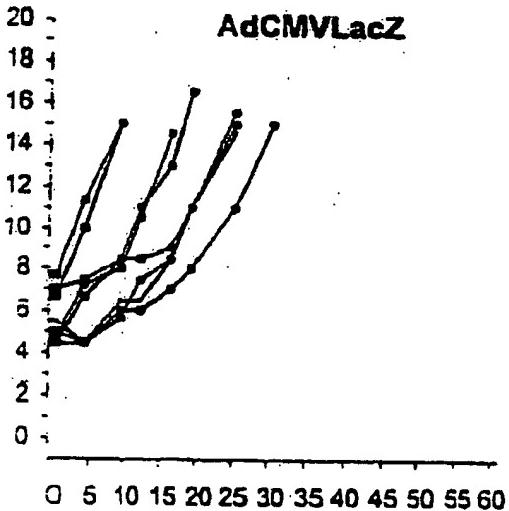


B

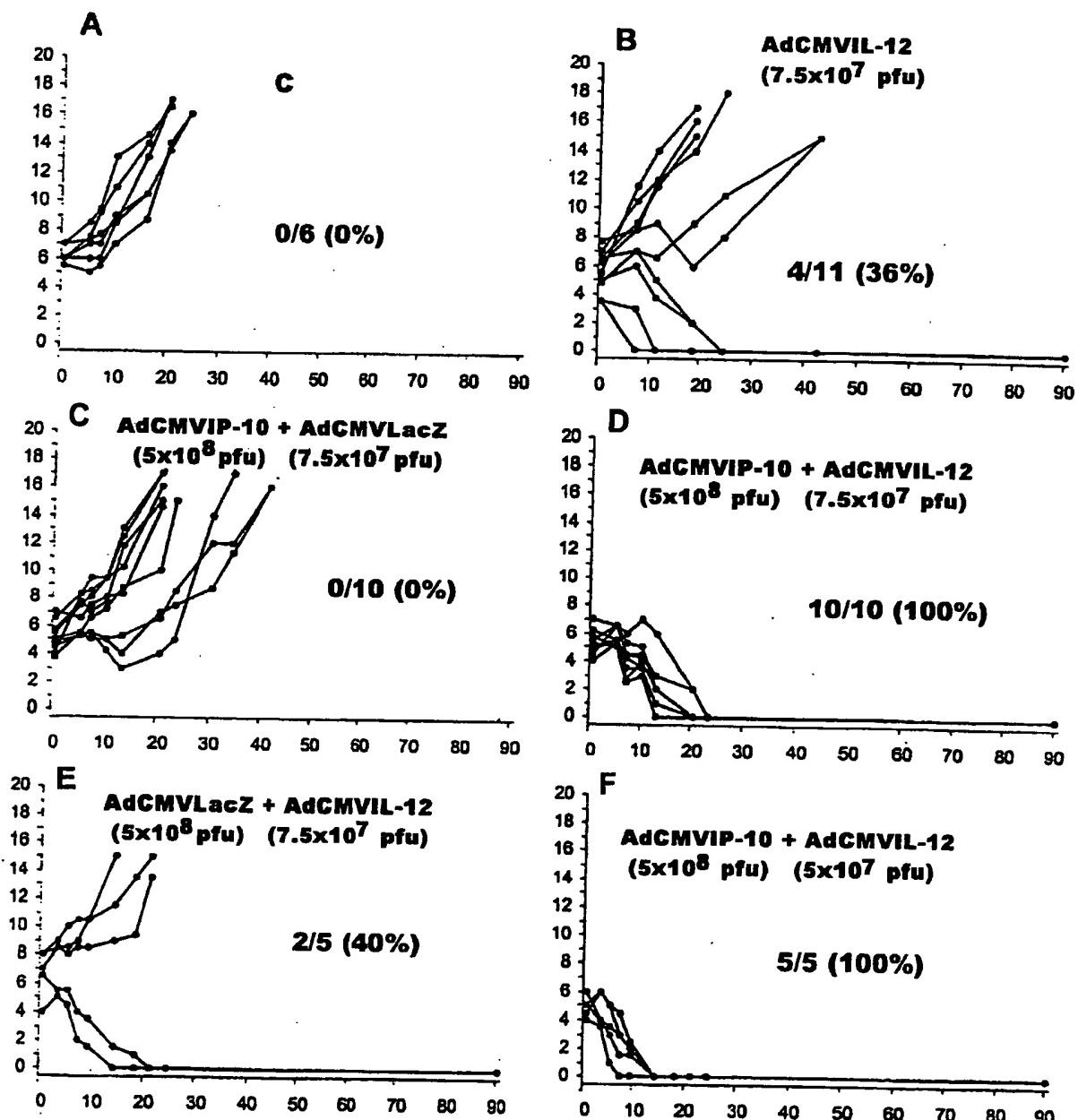


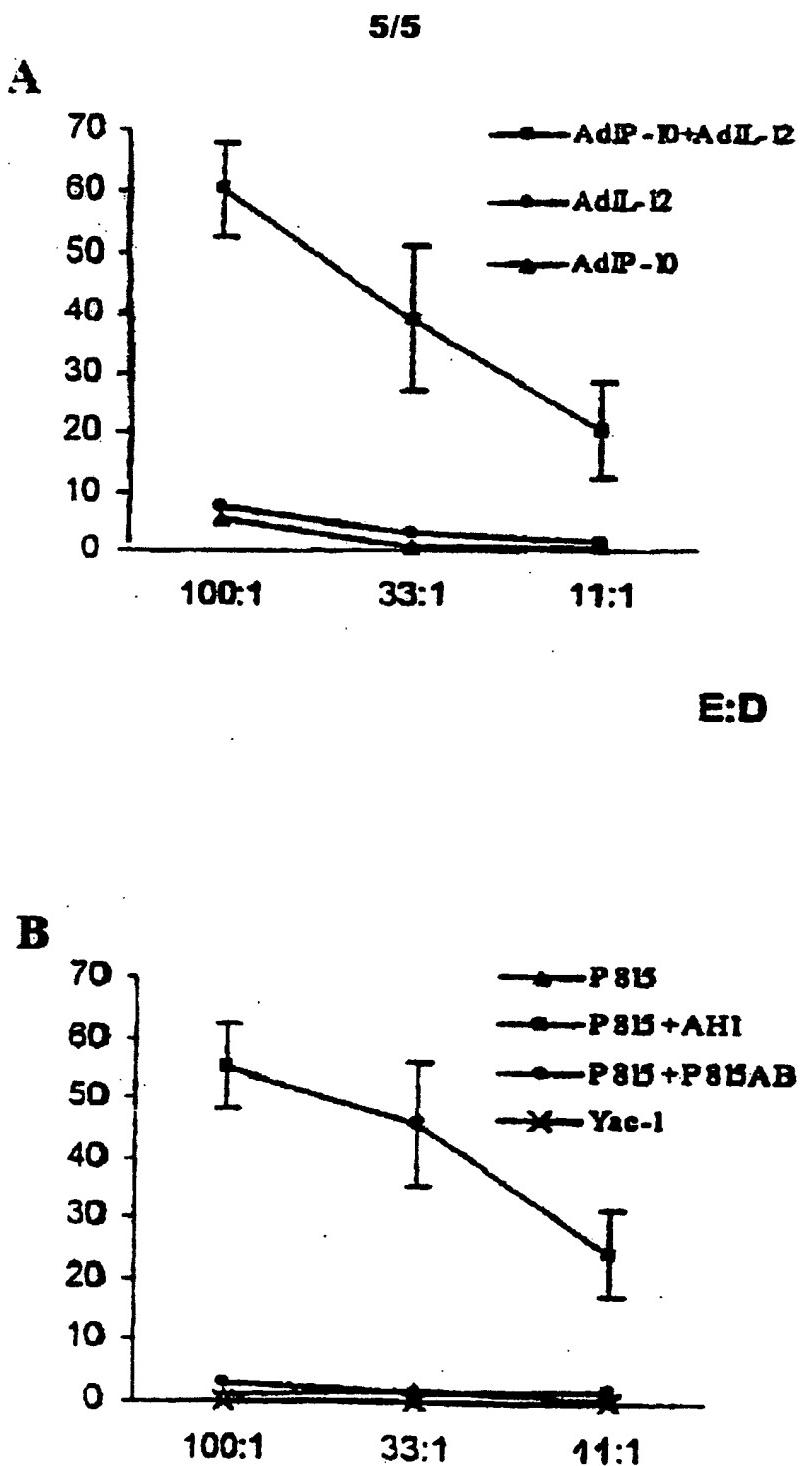
### **FIGURA 3**

C



4/5

**FIGURA 4**

**FIGURA 5**

- 1 -

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Instituto Científico y Tecnológico de Navarra, S.A.  
<120> Uso combinado de la quimiocina IP-10 y la interleu-  
cina-12 en la preparación de composiciones para el trata-  
miento de tumores malignos.

<130> P-99390

<160> 7

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sentido

<400>

(5'-ACCATGAACCCAAGTGCTGCCGTC-3')

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido antisentido

<400>

(5'-GCTTCACTCCAGTTAAGGAGCCCT-3')

<210> 3

<211> 297

<212> ADN

- 2 -

<213> plásmido PGEM-T/mIP-10

<220>

<223> cADN de mIP-10

<220>

<221> codón terminación

<222> 99

<400>

<210> 4

<211> 1063

<212> ADN

<213> Ratón

<220> gen IP10

<221> CDS

<222> 41..337

<220>

<221> sig\_peptido

<222> 41..103

<220>

<221> mat\_peptido

<222> 104..334

<220>

<221> TATA\_señal

- 3 -

<222> 1039..1045

<220>

<221> codón terminación

<222> 99

<300>

<301> Ohmori, Y. and Hamilton, T.A.

<302> A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10

<303> Biochem. Biophys. Res. Commun.

<304> 168

<305> (3)

<306> 1261-1267 (1990)

<400>

catcccgagc caaaccttccg gaaggcctccc catcagcacc atg aac cca agt gct gcc gtc	61
Met Asn Pro Ser Ala Ala Val	

5

att ttc tgc ctc atc ctg ctg ggt ctg agt ggg act caa ggg atc cct	109
Ile Phe Cys Leu Ile Leu Gly Leu Ser Gly Thr Gln Gly Ile Pro	

10

15

20

ctc gca agg acg gtc cgc tgc aac tgc atc cat atc gat gac ggg cca	157
Leu Ala Arg Thr Val Arg Cys Asn Cys Ile His Ile Asp Asp Gly Pro	

25

30

35

gtg aga atg agg gcc ata ggg aag ctt gaa atc atc cct gcg agc cta	205
Val Arg Met Arg Ala Ile Gly Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala Ser Leu	

40	45	50	55
----	----	----	----

tcc tgc cca cgt gtt gag atc att gcc acg atg aaa aag aat gat gag	253
Ser Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Asn Asp Glu	

60

65

70

cag aga tgt ctg aat ccg gaa tct aag acc atc aag aat tta atg aaa	301
Gln Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Thr Ile Lys Asn Leu Met Lys	

75

80

85

gcg ttt agc caa aaa agg tct aaa agg gct cct taa ctg gagtgaaagcc	350
Ala Phe Ser Gln Lys Arg Ser Lys Arg Ala Pro	

90

95

acgcacacac cccggtgctg cgatggatgg acagcagaga gcctctctcc atcactcccc	410
---	-----

- 4 -

tttacccagt ggatggctag tcctaattgc ccttggtctt ctgaaagggtg accagccgtg 470  
gtcacatcg ctgctactcc tcctgcagga tggatggtcaa gccatggtcc tgagacaaaa 530  
gtaactgccg aagcaagaat tctttaaggg ctggtctgag tcctcgctca agtggctggg 590  
atggctgtcc tagctctgta ctgtaagcta tggtaggtg cgacgcccctt caccatgtgc 650  
catgcccagg ctgctccccca caccctccctt gtcctcccta gctcaggctc gtcaagttcta 710  
agtttacctg agctctttta tttcagatgt aagactacaa atttaagttt gtaagcacga 770  
acttaaccac catcttccccca aggggttatac aagataactca gaggaacctg aaaatgtatg 830  
tgtaaatact atttaatgaa cgactgtaca aagtagaatt cctaatgtat tttttgtatg 890  
ctttgcattg tatatggaa aacttgtgtc atcaagtatg tatcaatggg tagttaaagt 1040  
ttatTTTaa aaccgtccaa tacctttgtt attatgtaac attcaaaaaga caatgtactg 1100  
tattgaaagt agtaagagac cccaaatgtaa ataaagtaat aataactgac atg 1153

<210> 5

<211> 1088

<212> ADN

<213> Ratón

<220>

<221> CDS

<222> 66..362

<220>

<221> polyA\_señal

<222> 1065..1070

<220>

<221> polyA\_sitio

<222> 1088

<220>

<221> codón terminación

<222> 99

<300>

<301> Vanguri, P. and Farber, J.M.

<302> Identification of CRG-2. An interferon-inducible mRNA predicted to encode a murine monokine

<303> J. Biol. Chem.

<304> 265

- 5 -

<305> (25)

<306> 15049.15057 (1990)

<400>

aagcgcttca	tccaccgctg	agagacatcc	cgagccaacc	ttccggaaagc	ctccccatca	60											
gcacc	atg	aac	cca	agt	gct	110											
Met	Asn	Pro	Ser	Ala	Ala												
				Val	Ile	Phe											
				Cys	Leu	Ile											
				Leu	Leu	Leu											
5				10		15											
ctg	agt	ggg	act	caa	ggg	atc	cct	ctc	gca	agg	acg	gtc	cgc	tgc	aac	tgc	161
Leu	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Ile	Pro	Leu	Ala	Arg	Thr	Val	Arg	Cys	Asn	Cys	
20							25					30					
atc	cat	atc	gat	gac	ggg	cca	gtg	aga	atg	agg	gcc	ata	ggg	aag	ctt	gaa	212
Ile	His	Ile	Asp	Asp	Gly	Pro	Val	Arg	Met	Arg	Ala	Ile	Gly	Lys	Leu	Glu	
35							40					45					
atc	atc	cct	gcg	agc	cta	tcc	tgc	cca	cgt	gtt	gag	atc	att	gcc	acg	atg	263
Ile	Ile	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Cys	Pro	Arg	Val	Glu	Ile	Ile	Ala	Thr	Met	
50							55					60			65		
aaa	aag	aat	gat	gag	cag	aga	tgt	ctg	aat	ccg	gaa	tct	aag	acc	atc	aag	314
Lys	Lys	Asn	Asp	Glu	Gln	Arg	Cys	Leu	Asn	Pro	Glu	Ser	Lys	Thr	Ile	Lys	
70							75					80					
aat	tta	atg	aaa	gcg	ttt	agc	caa	aaa	agg	tct	aaa	agg	gct	cct	taa	362	
Asn	Leu	Met	Lys	Ala	Phe	Ser	Gln	Lys	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Pro			
85							90					95					
ctggagag	aagccacgca	cacacccccc	tgctgtgatg	gacagcagag	agcctgtctc	420											
tccatcactc	ccctttaccc	agtggatggc	tagtcataat	tgcccttggt	cttctgaaag	480											
gtgaccagcc	gtggtcacat	cagctgtac	tcctcctgca	ggatgtatgg	taagccatgg	540											
tcctgagaca	aaagtaactg	ccgaagcaag	aattctttaa	gggctggct	gagtccctcac	600											
tcaagtggct	gggatggctg	tcctagctct	gtactgtaaag	ctatgtggag	gtgcgacgccc	660											
cttcaccatg	tgccacgccc	caggctgtc	cccacaccct	ccttgtcc	cctagctcag	720											
gctcgtagt	tctgagttt	cctgagctct	tttatttcag	atgtaagact	acaatattaa	780											
gtttgttaagg	acaaaacttaa	ccaccatctt	cccaagggtt	tatcaagata	ctcagaggaa	840											
cctggaaatg	tatgtgtaaa	tactattaa	tgaacgactg	tacaaagttag	aattcctaga	900											
tgtatTTT	gtatgtttt	cattgtatat	ggaagaacctt	gtgtcatcaa	gtatgtatca	960											
atgggtatTT	aaagtttattt	tttaaaaccg	tccaatacct	tttgtattat	gtaacattca	1020											
aaagacaatg	tactgtattt	aaagtagtaa	gagacccaaa	atgtataaaa	gtaataataa	1080											
ctgacatg						1088											

- 6 -

<210> 6

<211> 9

<212> péptido

<213> secuencia artificial

<220>

<223> AH1

<300>

<301> Huang, A.Y., P.H. Gulden, A.S. Woods, M.C. Thomas, C.D. Tong, W. Wang, V. H. Engelhard, G. Pasternack, R. Cotter, D. Hunt, D.M. Pardoll, and E.M. Jaffee.

<302> 1996

<303> Proc Natl Acad Sci USA

<304> 93

<306> 9730

<400>

Ser Pro Ser Tyr Val Tyr His Gln

<210> 7

<211> 9

<212> péptido

<213> secuencia artificial

<220>

<223> P815 AB

<300>

<301> Van den Eynde, B., B. Lethe, A. Van Pel, E. De Plaen, and T. Boon.

<302> 1991

<303> J Exp Med

<304> 173

<306> 1373

<400>

- 7 -

Leu Pro Tyr Leu Gly Trp Leu Val Phe

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES01/00066A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<sup>6</sup>:

IPC7 : A61K 38/19, 38/20, 48/00, A61P 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 : A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPIL, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NANNI, P. et al. "Interleukin 12 gene therapy of MHC-negative murine melanoma metastases". CANCER RESEARCH. Volume 58, n°6 15 March 1998 (15.03.98), pages 1225-1230, the whole document	1-12
X	LODE, H.N. et al. "CXC chemokine IP-10 mediated IL-12 gene therapy induced T-cell memory immune response is amplified by targeted IL-2. EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, Volume 35, n° SUPPL. 5 October 1999 (05.10.99), page 551, the abstract	1-12
X	Duda, D.G. et al. "Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of Interleukin 12. CANCER RESEARCH Vol. 60, n°4, 15 February 2000 (15.02.00), pages 1111-1116, the whole document	1-12

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 May 2001 (29.05.01)Date of mailing of the international search report  
06 June 2001 (06.06.01)Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office  
Facsimile No.Authorized officer  
Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 01/00066

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Narvaiza, I. et al. "Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN- $\gamma$ - inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy" JOURNAL OF IMMUNOLOGY. Volume 164, n° 6, 15.03.2000, pages 3112-3122, The whole document	1-12
A	WO 0006759 A (VALENTIS, INC.), 10.02.2000, The whole document	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
**PCT/ES 01/00066**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0006759 A	10.02.2000	AU 5318299 A	21.02.2000
		EP 1100941 A	23.05.2001

## INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES 01/00066

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**CIP<sup>7</sup>** A61K 38/19, 38/20, 48/00, A61P 35/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

**CIP<sup>7</sup>** A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPIL, PAJ, CA, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	NANNI, P. et al. "Interleukin 12 gene therapy of MHC-negative murine melanoma metastases". CÁNCER RESEARCH. Volumen 58, nº 6, 15.03.1998, páginas 1225-1230, todo el documento.	1-12
X	LODE, H.N. et al. "CXC chemokine IP-10 mediated IL-12 gene therapy induced T-cell memory immune response is amplified by targeted IL-2. EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, volumen 35, nº SUPPL. 5, octubre 1999, página 551, resumen.	1-12
X	Duda, D.G. et al. "Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of Interleukin 12. CANCER RESEARCH Vol. 60, nº 4, 15.02.2000, páginas 1111-1116, todo el documento.	1-12

 En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 29 mayo 2001 (29.05.2001)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional  
**6 JUN 2001 - 6. 06. 01**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado  
María Novoa SanjurjoC/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
nº de fax +34 91 3495304

nº de teléfono + 34 91 349 55 52

## INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud \_\_\_\_\_ n°

PCT/ES 01/00066

C (Continuación).

## DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
PX	Narvaiza, I. et al. "Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN- $\gamma$ - inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy". JOURNAL OF IMMUNOLOGY. Volumen 164, nº 6, 15.03.2000, páginas 3112-3122, todo el documento.	1-12
A	WO 0006759 A (VALENTIS, INC.), 10.02.2000, todo el documento.	1-12

**INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 01/00066

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0006759 A	10.02.2000	AU 5318299 A	21.02.2000
		EP 1100941 A	23.05.2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)